

家蚕细胞色素 P450 基因的研究进展

艾均文^{1,2,3}, 薛 宏¹, 何行健¹, 孟繁利¹, 朱 勇^{2,*}, 向仲怀^{3,*}

(1. 湖南省蚕桑科学研究所, 长沙 410127; 2. 西南大学生物技术学院, 重庆 400716; 3. 西南大学蚕学与系统生物研究所, 重庆 400716)

摘要: 细胞色素 P450 (P450s, CYPs) 超基因家族是由数量众多、功能复杂的一类血红蛋白酶基因所组成, 对许多结构多样的外源与内源化合物起着氧化代谢的作用。本文系统地综述了家蚕 *Bombyx mori* 基因组中 P450s 的数量与种类, 其数量比食腐昆虫和杂食性的植食昆虫少, 但比意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 多, 在基因组中大多呈串联重复排列, 基因结构与系统进化树之间有着紧密的联系。家蚕与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* P450s 的比较基因组学分析发现, 存在 10 对直向同源基因, 但 *CYP3* 与 *CYP4* 集团 (Clan) 的 P450s 表现出种属特异性扩增。家蚕 P450s 与其蜕皮激素和保幼激素合成代谢有关, 并涉及到对氟化物与杀虫剂抗性。家蚕作为鳞翅目昆虫的代表, 通过对其 P450s 的研究, 可望为其他昆虫, 特别是鳞翅目昆虫的生长发育研究和抗性治理提供理论依据和研究模式。

关键词: 家蚕; 细胞色素 P450; 多样性; 进化; 模式昆虫

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2011)08-0918-09

Research advances in cytochrome P450 genes in the silkworm, *Bombyx mori*

AI Jun-Wen^{1,2,3}, XUE Hong¹, HE Xing-Jian¹, MENG Fan-Li¹, ZHU Yong^{2,*}, XIANG Zhong-Huai^{3,*}

(1. The Sericultural Research Institute of Hunan Province, Changsha 410127, China; 2. College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China; 3. Institute of Sericulture and System Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: The cytochrome P450 monooxygenases (P450s, CYPs) constitute a large and complex superfamily of heme-thiolate proteins, which are responsible for the oxidative metabolism of structurally diverse endogenous and exogenous compounds. In this review, recent progress in *Bombyx mori* P450 diversity, multiple functions, genomic distribution, intron-exon organization and the evolutionary relationships to P450s from *Drosophila melanogaster* is summarized, and the proposals of *B. mori* P450 study are also put forward. In the silkworm, the paralog count for P450s is lower than those found in other scavengers and omnivorous phytophagous insects, but substantially higher than that observed in *Apis mellifera*. The distribution of *B. mori* P450s in the genome indicates that most of them are tandem arranged on chromosomes. There is a relatively good correlation between intron-exon organization and phylogenetic relationship among these multiple P450s. Comparison of the P450s from *B. mori* to the P450s from *D. melanogaster* reveals that there are 10 pairs of recognizable orthologs and the P450s in *CYP3* and *CYP4* clans are present with species-specific expansion. These diverse P450s have been demonstrated to be associated with growth and development, tolerance to fluoride and resistance to insecticides. The silkworm is a good representative insect of the order Lepidoptera, and it is so expected that it might found theoretical basis and model system for developmental regulation and resistance management of other insects, especially for lepidopteran insects, with the further study of *B. mori* P450s.

Key words: Silkworm; cytochrome P450 monooxygenase; diversity; evolutionary relationship; model insect

细胞色素 P450 超基因家族是由数量众多、功 动物、植物、真菌和细菌等生物中。它具有多功能
能复杂的一类血红蛋白酶基因所组成, 广泛存在于 氧化酶(mixed function oxidase, MFO)的作用, 参与

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA10A117); 现代农业(蚕桑)产业技术体系建设专项(CARS-22); 湖南省科学技术厅项目(2010NK3050); 湖南省农业厅项目(2008-01-05)

作者简介: 艾均文, 男, 湖南常德人, 1968 年生, 博士, 研究员, 主要从事桑蚕种质资源与分子生物学研究, E-mail: jwai718@sina.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhuy@swu.edu.cn; xbxzh@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2010-05-12; 接受日期 Accepted: 2011-06-07

了生物体中许多重要生命过程，是自然界中最具功能多样性的生物催化剂(Coon, 2005)。它对异生物质的代谢特性导致了昆虫对杀虫剂的抗药性和对植物有毒物质的耐受性，它还参与了昆虫体内保幼激素、蜕皮激素和脂肪酸等内源化合物的合成与代谢(Scott *et al.*, 1998; 郭亭亭等, 2009)。家蚕 *Bombyx mori* 是鳞翅目昆虫的模式生物，鳞翅目是昆虫中的第二大目，其中许多种类是极具破坏性的农业害虫，家蚕细胞色素 P450s 的研究将会为昆虫内源性与外源性化合物代谢及抗性产生机理探索提供重要的研究典范，也会促进鳞翅目害虫的生物防治技术

发展。特别是家蚕是第一个进行了全基因组测序的鳞翅目昆虫，家蚕细胞色素 P450s 的研究也随之进入了基因组学研究时代。

1 家蚕 P450 的序列多样性

截止至 2011 年 4 月，在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上登录的家蚕 P450 基因已有 102 条蛋白质序列，其中包含有 85 条家蚕序列，17 条野桑蚕 *Bombyx mandarina* 序列。通过比对分析发现家蚕中已有 32 个基因得到克隆登录，野桑蚕中有 16 个基因也已克隆(表 1)。

表 1 已克隆的家蚕 P450 基因
Table 1 The cloned P450 genes in the silkworm

所属集团 Clan	基因名称 Gene name
CYP2 Clan (5)	CYP307A1, CYP15C1, CYP18A1*, CYP306A1, CYP305B1*
Mito. Clan (4)	CYP339A1, CYP302A1, CYP314A1, CYP315A1
CYP3 Clan (18)	CYP366A1, CYP337A1, CYP332A1, CYP6AU1*, CYP6AW1*, CYP6AB4*, CYP6AB5*, CYP6AE2*, CYP6AE3, CYP6AE7, CYP6AE8*, CYP6AE9*, CYP6B29*, CYP9A19*, CYP9A20*, CYP9A21*, CYP9A22*, CYP9G3
CYP4 Clan (5)	CYP4M5*, CYP4M9*, CYP4G22, CYP4G23, CYP4L6

括号中为所属集团的已克隆基因数量，* 表明野蚕的 P450 等位基因也已克隆登录。由于 CYP6AE 的命名较为混乱，此处根据作者提交给 Nelson (dnelson@uthsc.edu) 的基因组序列进行了命名整理。The number in bracket indicates the amount of the cloned genes in each silkworm P450 Clan, and the alleles marked with an asterisk are also cloned for *Bombyx mandarina*. Based on the silkworm P450 genome sequences we submitted to David R. Nelson (dnelson@uthsc.edu), the names of CYP6AE subfamily were adjusted because of their confused names.

随着家蚕基因组测序的完成，Li 等(2005)根据 6 × 基因组数据进行基因组学分析，推测家蚕基因组中有 86 个 P450 基因，分布于 60 个 Scaffolds，在每个 Scaffold 中不超过 2 个成员，未发现 P450 基因串联排列的现象，并认为这是由于基因组草图中存在许多 gap 所致。在此基础上，Nelson 根据基因组基因枪序列重新比对分析，认为家蚕中大约有 79 个 P450 基因 (<http://drnelson.utmem.edu/silkworm.html>, 2004 年 7 月)。Ai 等(2011)根据 9 × 基因组数据开展进一步的基因组学分析，结果发现家蚕基因组中共有 84 个 P450 基因，其中有 78 个功能基因，6 个可能的假基因。根据氨基酸序列的相似程度来确定所属家族与亚家族，这些功能基因可分为 26 个家族，47 个亚家族，提交国际 P450 命名委员会后分别给予了正式命名，构建了相应的进化树(图 1)，其中基因数量最多的家族为 CYP6，它含有 7 个亚家族，14 个功能基因，2 个可能的假基因，CYP4, CYP340 和 CYP341 等家族基因数量次之。CYP6B, CYP6AE, CYP6AB, CYP9A, CYP340

和 CYP341 等家族或亚家族为鳞翅目昆虫所特有。通过对预测基因的序列延伸，共得到了 70 个全长基因。家蚕基因组 P450 基因数量比黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 91 个略有减少，但比冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的 112 个、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的 164 个、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 144 个则明显减少，比西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的 48 个则明显增多(Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008)。这主要是因为家蚕是寡食性的植食昆虫，而冈比亚按蚊、埃及伊蚊与赤拟谷盗分别是杂食性的食腐昆虫和杂食性的植食昆虫，果蝇也是食腐性昆虫之一，需要有更多的 P450 基因来应对相对复杂的生活环境，而西方蜜蜂的气味受体基因数量与其他昆虫比较存在明显扩增，加上它的高度社会性群居等生活行为导致了与昆虫代谢抗性相关的 3 个超基因家族数量明显减少(Claudianos *et al.*, 2006; Robertson and Wanner, 2006)。值得提出的是，杂食性的鳞翅目主要害虫棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 与草地贪夜蛾

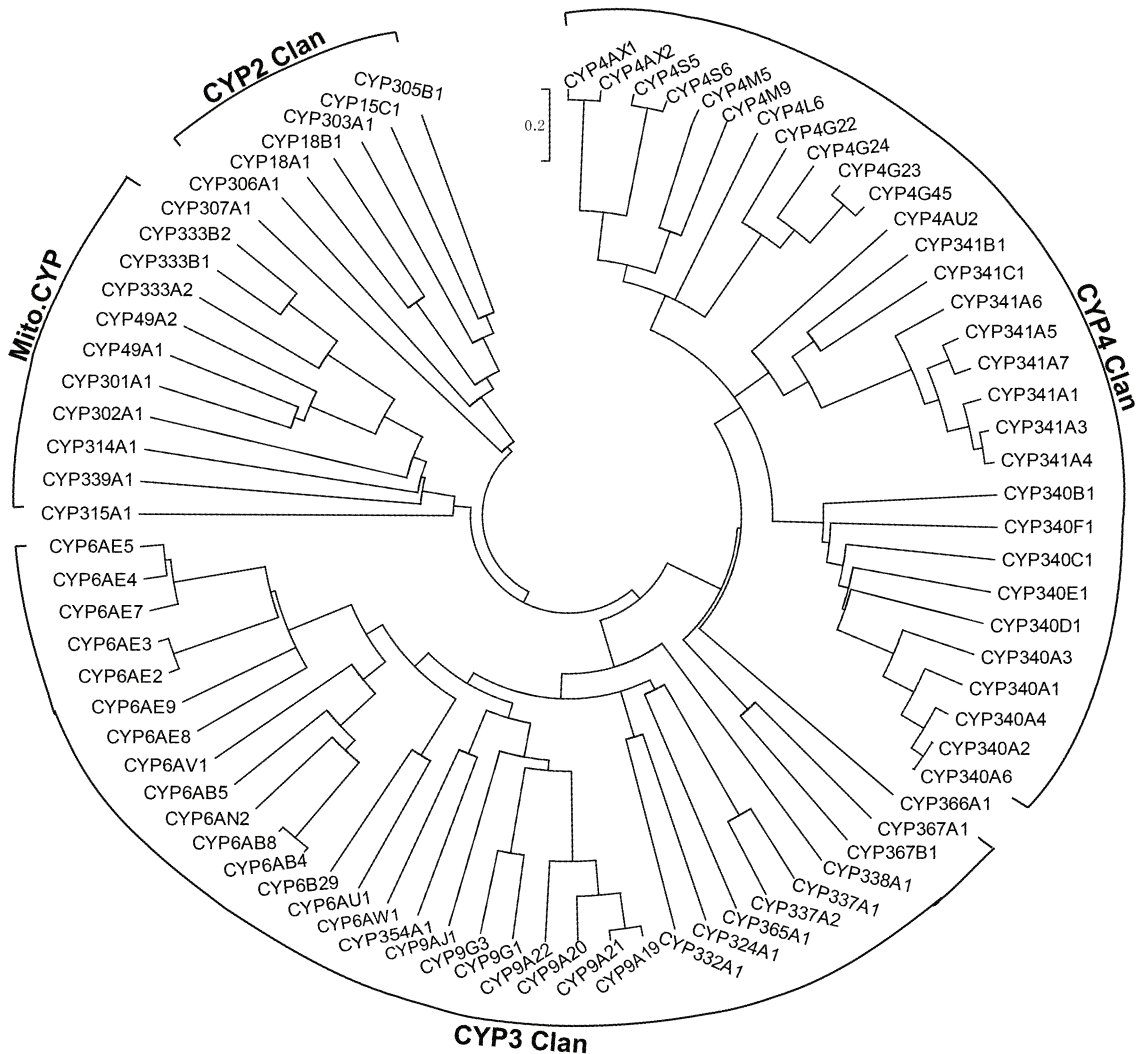


图1 家蚕 P450 功能基因的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the functional P450 genes in the silkworm

用 ClustalX1.83 和 MEGA4.0 进行序列比对和进化树构建, 进化树构建方法为 UPGMA 法, bootstrap 检验重复 1 000 次。圆弧外标明各基因所属的 4 个不同的昆虫 P450 集团 (Clan), 即: *CYP2*, *CYP3*, *CYP4* 和线粒体集团 (Ai *et al.*, 2011)。*CYP6AE3* 已通过克隆表明为功能基因。Sequences were aligned using ClustalX 1.83 and the phylogenetic tree reconstruction was performed using the UPGMA algorithm in MEGA4.0 with a bootstrap of 1 000 replicates. The P450 genes were marked for each clan (*i. e.*, *CYP2*, *CYP3*, *CYP4* or the mitochondrial P450 clan) on the circle. *CYP6AE3* was proved to be a functional gene by molecular cloning.

Spodoptera frugiperda 基因组中出现了比家蚕更多的 P450 复制现象 (d'Alençon *et al.*, 2010), 我们推测其 P450 基因数量也应比家蚕多。

2 家蚕 P450 的功能多样性

P450 功能的多样性是其种类的多样性以及底物的广谱性所决定的。已有的研究表明, 家蚕 P450 基因一方面催化包括蜕皮激素、保幼激素等在内的内源性物质的生物合成与降解, 维持生物体正常的生理功能, 另一方面催化包括杀虫剂、植物

次生物质、氟化物等在内的异生性物质的代谢, 使生物体适应生活环境或产生相应的抗性。

2.1 参与蜕皮激素的合成与代谢

蜕皮激素对昆虫生长、发育和繁殖有重要的调控作用, 尤其是对蜕皮和变态过程。目前一些研究表明昆虫细胞色素 P450 基因参与了蜕皮激素的合成与代谢。

对果蝇的 Halloween 突变家族基因的研究发现, 在线粒体集团和 *CYP2* 集团 (Clan) 中至少有 5 个 P450 基因分别参与了蜕皮激素合成的不同步骤 (图 2: A) (Rewitz *et al.*, 2007)。*Cyp306a1*

(*Pantom*), *Cyp302a1* (*Disembodied*), *Cyp315a1* (*Shadow*) 和 *Cyp314a1* (*Shade*) 分别参与了最后 4 个步骤, 即由 2,22,25-三脱氧蜕皮酮(ketodiol, 2,22,25-dE, 2,22,25-trideoxyecdysone) 合成具有催化活性的 β -蜕皮素(20E, 20-hydroxyecdysone) 的反应过程。横向同源基因(paralog) *CYP307A1* (*Spook*), *CYP307A2* (*Spookier*) 和 *CYP307B1* (*Spookiest*) 参与了昆虫蜕皮激素合成过程中“黑匣子(black box)”的某一步骤, 即中间产物 7-脱氢胆固醇(7-dehydrocholesterol, 7dc) 转化成另一中间产物 2,22,25-三脱氧蜕皮酮的过程(Ono *et al.*, 2006)。目前, 包括家蚕在内的多个昆虫 P450 基因中的直向同源基因(ortholog) 得到测序与功能研究(图 2: B)。Horike 等(2000)发现在家蚕早期胚胎发育过程中蜕皮激素-20-单加氧酶的活性依赖于细胞色素 P450 还原酶的表达。Maeda 等(2008)从家蚕卵中克隆得到了 *CYP314A1*, 它在未滞育卵原肠胚期的后期表达明显升高, 在器官发生期达到最高, 其后随胚胎发育完成又逐渐下降。进一步用杆状病毒表达系统在 Sf9 细胞中表达该蛋白, 该蛋白能将 α -蜕皮素(ecdysone, E) 转化成 β -蜕皮素, 表明该基因为 C-20-羟基化酶(20-hydroxylase) 基因。Niwa 等(2004)在家蚕前胸腺中克隆得到了 *CYP306A1*, Northern 杂交分析表明该基因表达与蜕皮激素代谢紧密相关, 通过 S2 细胞的转染试验发现了它能够将 ketodiol 转换成 ketotriol, 直接表明该基因编码 C-25-羟基化酶(25-hydroxylase)。Niwa 等(2005)利用营茧期幼虫的前胸腺建立全长 cDNA 文库克隆得到 *CYP302A1*, 该基因表达在家蚕 5 龄幼虫上簇第 1 天达到表达峰值, 而且能被促前胸腺激素(prothoracicotropic hormone, PTTH) 所诱导, 同样 S2 细胞的转染方法能将 2,22-二脱氧蜕皮酮转化成 2-脱氧蜕皮酮, 表明该基因表达 C-22-羟基化酶(22-hydroxylase)。Namiki 等(2005)利用荧光标记差异显示技术对在家蚕 5 龄幼虫到蛹期阶段的前胸腺表达基因进行表达分析克隆, 得到了另外一个 Halloween 家族基因 *CYP307A1*, 从基因表达、蜕皮激素与促前胸腺激素(PTTH) 诱导试验分析, 推测该基因应与家蚕蜕皮激素合成有关。Warren 等(2004)在对家蚕 *CYP306A1* 进行研究时, 也同时克隆得到了另一个 Halloween 家族基因 *CYP315A1*, 该基因的表达与家蚕体内蜕皮激素含量变化紧密一致(Namiki *et al.*, 2005), 而该基因的直向同源基因在果蝇中能将 2-脱氧蜕皮酮(2dE) 转化成 α -蜕皮

激素(E)。

昆虫 P450 基因不仅与昆虫蜕皮激素合成有关, 而且还参与其代谢分解。Hurban 和 Thummel (1993)通过蜕皮激素对果蝇进行诱导, 结合 cDNA 消减杂交得到一个与蜕皮激素代谢有关基因 Eig-17, 该基因为 *CYP18a1* (Bassett *et al.*, 1997)。Davies 等(2006)发现鳞翅目昆虫灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 的直向同源基因 *CYP18A1* 能被非甾醇兴奋剂 RH-5992 诱导。Guittard 等(2011)利用 RNAi 与插入 P 元件(P element)方法分别沉默果蝇 *Cyp18a1*, 能产生幼虫发育时间延长, 死蛹显著增加的现象, 突变蛹的蜕皮激素因不能及时正常降解而出现一个延时的峰值。通过 GAL4/UAS 转基因系统使该基因超量表达, 可引起大量末龄幼虫死亡, 少量在蛹早期死亡。利用果蝇 S2 细胞的转染试验, 发现 *Cyp18a1* 能将具有活性的 β -蜕皮素转化成非活性的 20, 26-二羟蜕皮酮(20, 26E, 20, 26-dihydroxyecdysone), 为 C-26 羟基化酶(26-hydroxylase)。同时, 该基因还能进一步催化形成相应的蜕皮酸(20Eoic, 20-hydroxyecdysoneic acid)。艾均文等(2008)通过家蚕基因组预测序列克隆得到了家蚕 *CYP18A1*, 该基因的表达变化与家蚕体内蜕皮激素的波动相一致, 且发现在营茧期的第 2 天出现表达峰值, 推测该基因应是 C-26-羟基化酶基因。Hossain 等(2008)利用经过蜕皮激素诱导的家蚕 5 龄幼虫的头部建立 cDNA 文库克隆得到了家蚕 *CYP18a1*, 原位杂交发现该基因在前胸腺表达, 且同样在家蚕化蛹前达到一个表达峰值。

此外, 我们利用基因组预测序列与家蚕 EST 数据库比对搜索, 发现了一个线粒体基因在精巢中高量表达, 而该基因主要与昆虫内源物质代谢有关, 进而克隆了该基因 *CYP339A1* (GenBank 登录号: NP_001121192.1)。高瑞娜等(2010)对经蜕皮激素诱导后的家蚕部分 P450 基因进行检测, 结果在脂肪体中检测到了该基因的高转录活性, 与对照组相比转录水平上调了 421 倍, 可以推测该基因可能与家蚕蜕皮激素代谢有密切联系。

2.2 参与保幼激素的合成

保幼激素(juvenile hormone, JH)是节肢动物的重要内激素, 具有保持幼虫形态、性状, 促进生殖腺成熟、成虫滞育和产生信息素等功能。Helvig 等(2004)从太平洋折翅蠅 *Diploptera punctata* 咽侧体的 900 多条 ESTs 中拼接出一条 P450 基因序列, 被命名为 *CYP15A1*; 该基因与果蝇的 P450 还原酶等

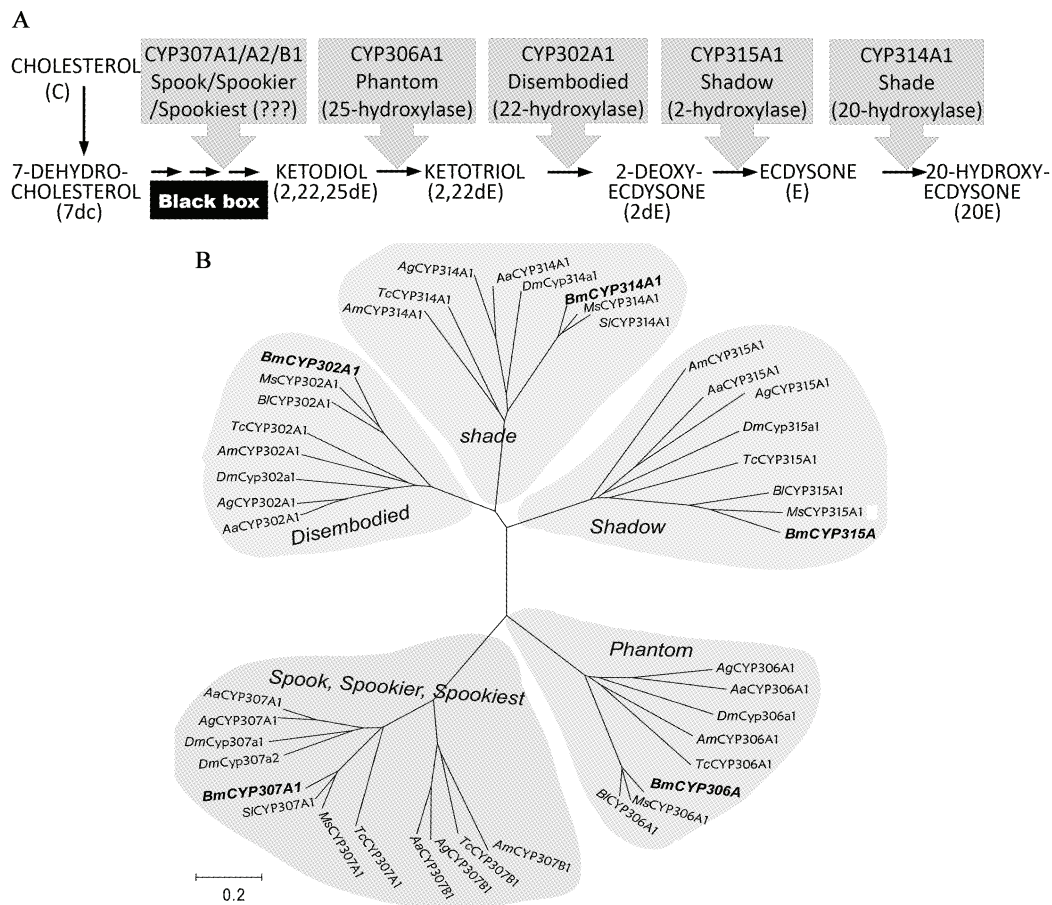


图2 Halloween 家族直向同源 P450 基因参与昆虫蜕皮激素合成的过程 (A) 及其系统进化树 (B) (引自 Rewitz *et al.*, 2007)

Fig. 2 The biosynthetic scheme with the functions of the P450 genes encoded by the Halloween genes (A) and the phylogenetic relationship of orthologous insect P450 genes (B) (adapted from Rewitz *et al.*, 2007)

Bm: 家蚕 *Bombyx mori*; Ms: 烟草天蛾 *Manduca sexta*; Sl: 灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis*; Dm: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*; Ag: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*; Aa: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*; Tc: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; Am: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*. 除家蚕外的所有 P450 序列均从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载。The amino acid sequences of insect P450 genes were downloaded from NCBI with exception of BmP450 genes.

组成重组酶系, 能将 2E-6E-甲基法尼酸酯 (2E,6E-methyl farnesoate) 转化成 JH III, 起环氧化作用; 该基因在咽侧体中表达变化和保幼激素合成时间吻合, 这些结果表明该基因表达产物为保幼激素合成的环氧化酶 (epoxidatase)。通过家蚕 P450 基因组学分析发现, 家蚕中存在一个直向同源基因 *CYP15C1*, 它的氨基酸序列和 CYP15A1 有 43% 的同一性 (艾均文, 2008), 现在它已从家蚕咽侧体中得到了克隆 (GenBank 登录号: NM_001146725.1)。该基因在许多昆虫基因组中呈现 1:1 的直向同源关系, 其在家蚕中的功能有待于下一步实验证实。

2.3 与氟化物抗性相关功能

工业化造成的氟化物污染对蚕业生产的严重危害已引起蚕业界广泛关注。米智等 (2010) 发现家蚕氟化物抗性品系 T6 在诱导后, 中肠组织的细胞色素 P450 含量比对照组高 3~7 倍, 而对敏感品

系 734 诱导作用不明显, 说明 P450 与家蚕的抗氟性紧密相关。该酶系的组成之一细胞色素 b5 含量的变化还与 P450 具有较高的一致性, 表明 P450 酶的活性也与之相关。陈玉华等 (2006) 通过 Northern 杂交方法发现野桑蚕的 *CYP305B1v1* 能被氟化物诱导而表达量增高。Zhou 等 (2008) 利用荧光差异显示技术对家蚕抗性品系与敏感品系中肠组织进行比较分析, 结果从只存在于抗性品系中的一条特异性电泳条带克隆得到一个家蚕 P450 基因 *CYP306A1*, 实时定量 PCR 表明该基因在抗性品系中具有高转录活性; 对包括中肠、血液、卵巢、丝腺、脂肪体在内组织进行半定量 PCR 分析, 结果表明该基因只在中肠和卵巢中表达。有趣的是该基因还是 C-25-羟基化酶基因, 与家蚕蜕皮激素合成有关, 进一步表明了 P450 基因的底物广谱性与功能的多样性。

2.4 杀虫剂的诱导表达

人类对昆虫杀虫剂抗性研究一般目的是昆虫的抗性治理,但对家蚕而言主要目的是提高对杀虫剂的抵抗力。王燕红等(2009)对野桑蚕进行溴氰菊酯诱导,发现 *CYP4M5* 在中肠和脂肪体中表达量分别增加 1.1 倍和 4.4 倍。赵华强等(2010)利用氯氰菊酯诱导野桑蚕,以硝基苯甲酰脱甲基酶(PNOD)活性检测 P450 酶,结果表明诱导 24 h 后 PNOD 在中肠中的活性增加了 12.2%,在脂肪体中的活性增加了 18.7%;对 *CYP9* 基因的表达水平进行半定量 PCR 方法分析发现, *CYP9A21* 在中肠的 mRNA 表达量是对照的 2.1 倍, *CYP9A20*, *CYP9A21*, *CYP9G3* 在脂肪体中 mRNA 表达量分别是对照的 1.9, 3.5 和 1.4 倍。这些结果表明 P450 酶活性增强与表达上调可能与野桑蚕对菊酯类杀虫剂代谢解毒增强有关。Yamamoto 等(2010)利用二嗪农(diazinon)、吡虫啉(imidacloprid)、苄氯菊脂(permethrin)等不同类型的农药分别对家蚕进行诱导,微阵列分析表明二嗪农与 *CYP4M5*, *CYP4G22* (*CYP4G25*) 和 *CYP333A2* (BGIBMGA005356),吡虫啉与 *CYP9A20*, *CYP4G22* 和 *CYP333A2*,苄氯菊脂与 *CYP4G22* 和 *CYP333A2* 之间呈现出诱导表达上调的联系,其中 *CYP4G22* 可在吡虫啉、苄氯菊脂诱导下分别上调表达 8.3 和 8.9 倍。

3 家蚕 P450 的进化

Gotoh(1993)认为 P450 酶存在于所有原核与真核生物体内,该酶系应是相当古老的酶系之一,目前所有 P450 基因应是从一个古老基因进化而来。在线虫 *Caenorhabditis elegans* (Gotoh, 1998)、黑腹果蝇(Tijet *et al.*, 2001)等基因组中,基因复制是 P450 基因进化的普遍现象,其内含子结构呈现普遍保守。

3.1 家蚕 P450 的串联重复排列

Ai 等(2011)利用家蚕 P450 预测序列与家蚕基因组序列进行比对发现,84 个 P450 基因分布于 36 个不同的 Scaffolds,其中 80 个可定位到 19 条不同染色体上。50 个 P450 基因呈现出头尾相连的串联排列,如果将 3 个基因串联定义为基因簇,则家蚕存在 8 个基因簇,包含了 38 个基因,6 个假基因中的 5 个也位列其中,说明这些假基因产生与基因复制过程中的不均等交换有关(Nelson *et al.*, 2004)。同时,复制基因的部分多重拷贝未能获得进一步的

新功能或亚功能化,失去选择压力,突变频率会加快,进而产生各种形式的突变而成假基因(Force *et al.*, 1999)。最大的基因簇位于 26 号染色体上的 *CYP340* 基因簇,共有 7 个功能基因,2 个假基因。此外,还发现了一个混合基因簇,即包含 2 个线粒体基因 *CYP333B1*, *CYP333B2* 与一个微粒体基因 *CYP4L6*,它们之间还有一个相同的 1 相内含子,而这一内含子为 *CYP3* 集团与 *CYP4* 集团的 P450 基因所共有,这是昆虫中混合基因簇的首次发现,进一步证明了线粒体 P450 是由微粒体 P450 进化而来的推断(Omura, 1993)。Ai 等(2010)首次实验证实了位于家蚕 17 号染色体上 *CYP9A* 基因簇,其中 3 个同转录方向的基因串联重复,另一个反方向转录基因被 4 个串联的乙醇脱氢酶基因所间隔,而且这 4 个基因具有完全相同大小的开放阅读框,基因结构也完全保守,均具有 9 个内含子,10 个外显子,经历了 3 次复制事件,其中 1 次为反向复制。

3.2 家蚕 P450 的内含子

Gilbert(1987)曾提出现在基因内含子中一定带有古老基因的进化遗迹。Ai 等(2011)利用 wise2 程序对家蚕 P450 基因进行基因结构分析,发现基因结构与系统进化树之间存在紧密联系,即:进化距离越近,基因结构越相似,进化距离越远,基因结构差异越大。家蚕 P450 基因的内含子与果蝇的相比,家蚕内含子(平均 200 ~ 1 250 bp)比果蝇(平均 50 ~ 70 bp)的大,其内含子密度(每 kb CDS 所含的内含子个数)与内含子比例(每 kb CDS 所含的内含子总 kb 数)均有增大趋势,这应与基因组致密性有关(Rogozin *et al.*, 2003)。Ai 等(2011)还发现了家蚕 P450 基因保守的 3 个古老内含子,它们分别被不同昆虫集团 P450 基因所共有,表明这些不同集团 P450 基因在起源上存在着一定的联系。果蝇中难以发现这种保守内含子(Tijet *et al.*, 2001),这主要与果蝇的 P450 基因普遍存在内含子丢失现象有关。

3.3 与其他昆虫基因组 P450 的比较分析

利用家蚕与果蝇的 P450 基因进行基因组学比较分析(Ai *et al.*, 2011),主要与外源化合物代谢相关 *CYP3* 集团与 *CYP4* 集团的 P450 基因均存在大量扩增。其中 *CYP3* 集团主要与外源化合物代谢相关, *CYP4* 集团则主要与植物次生物质代谢有关(Feyereisen, 2006)。果蝇 *CYP3* 集团的 P450 基因数量比家蚕多,但 *CYP4* 集团的 P450 基因数量比家蚕少,它们在系统进化分析中均表现出了种属特异性,难以发现它们之间共同的直向同源基因,这

是它们应对各自不同的生存环境与取食对象的选择压力所致。但在主要与内源物质代谢相关的 *CYP2* 集团与线粒体集团的 P450 基因数量上大致相等, 在进化树上可以发现包括 Halloween 家族在内的 10 对直向同源基因 (*CYP18A*, *CYP303A*, *CYP305A*, *CYP306A*, *CYP307A*, *CYP315A*, *CYP301A*, *CYP302A*, *CYP314A* 和 *CYP49A*), 说明这些基因的结构与功能保守性。特别是还在线粒体集团中发现了果蝇 *CYP12* 与家蚕 *CYP333* 的直向同源基因对, *CYP333* 应和 *CYP12* 一样与异生物质

代谢有关。

通过昆虫基因组之间的微共线性 (microsynteny) 分析 (Ai *et al.*, 2011), 家蚕、果蝇和蜜蜂的 *CYP18A1* 与 *CYP306A1* 存在线性保守, 它们分别位于家蚕的 10 号、西方蜜蜂的 13 号和果蝇的 X 染色体上, 内含子结构也高度保守 (图 3), 暗示了它们功能上的同一性。在家蚕中, *CYP18* 产生了一次独立的基因复制, 家蚕基因组表达芯片数据显示 *CYP18B1* 只在雌蛹后期与成虫期表达, 推测可能与雌发育或家蚕生殖有关 (Ai *et al.*, 2011)。

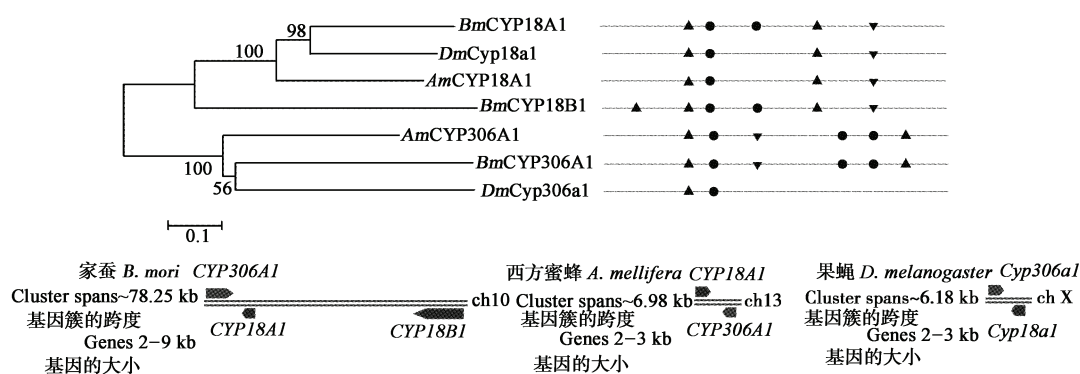


图 3 昆虫 *CYP306* 与 *CYP18* 的基因结构与共线性示意图 (引自 Ai *et al.*, 2011)

Fig. 3 Intron-exon organizations and physical locations of *CYP306* and *CYP18* from different insect species (adapted from Ai *et al.*, 2011)

0, 1 和 2 相内含子分别用 “●”、“▲” 和 “▼” 表示。Phase zero, 1, and 2 introns are shown by “●”, “▲” and “▼”, respectively.

4 小结与展望

细胞色素 P450 作为昆虫中三大与代谢抗性相关的超基因家族之一, 对昆虫抗性起着非常重要的作用, 同时又对昆虫生长发育有着十分关键的功能。由上述内容可以看出, 在 P450 基因的进化过程中, 与昆虫生长发育相关的基因功能相对保守, 与代谢抗性相关的基因作用则和昆虫特殊的生长环境及取食习性相适应。家蚕 84 个 P450 基因中主要与代谢抗性相关的 *CYP3* 和 *CYP4* 集团的 P450 基因产生大量的串联复制, 数量众多, 往往它们之间存在一定程度的底物相似性或重叠性, 在功能上表现出一定程度的冗余, 使其介导的昆虫抗性在应对外部选择压力时具有较强的弹性 (Scott and Kasai, 2004)。该类 P450 基因能被多种不同异生物质所诱导, 这些数量众多的横向同源基因及突变等位基因组成了生物体为应对外界环境的不断变化而选择表达的基因储备库 (Feyereisen, 2005), 其一定

种类和数量的 P450 基因在一定条件诱导下表达对昆虫来说也是一种能量节省的适应机制 (Snyder *et al.*, 1993)。

昆虫在与植物的协同进化过程中, 一方面它能改变取食策略或调节生长发育节律对植物的防御进行抵抗, 另一方面它又能利用自身的生理调节机制与解毒酶降解植物产生的有毒物质来进行主动地反防御。昆虫 P450 基因不仅能直接参与植物次生有毒物质的代谢降解, 而且已有研究表明它还参与了窃听 (eavesdrop) 植物的分子信号来活化自身解毒酶活性的过程, 如: 美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 的 *CYP6B* 基因 (Li *et al.*, 2002)。加强 P450 基因参与昆虫反防御机制的研究, 一定会推动害虫治理向分子水平的技术进步。家蚕作为重要的经济昆虫和实验动物, 是第一个完成了全基因组测序的鳞翅目昆虫, 其基因组中 P450 基因已经得到序列分析与功能的初步预测, 利用微阵列等基因组学研究技术对其数量众多与功能多样的 P450 基因进行功能验证与深入研究已成为可能 (Hemingway *et al.*,

2002)。鳞翅目昆虫间存在广泛的线性保守(d' Alençon *et al.*, 2010), 如 *CYP9A*, *CYP332A1* 等就在家蚕与其他几种鳞翅目昆虫基因组中表现出线性保守关系。通过比较基因组学研究可为农林害虫主要类群鳞翅目建立研究模式, 家蚕 P450 基因的更深入研究可望为鳞翅目昆虫的生长发育、抗性治理提供理论依据。

参 考 文 献 (References)

- Ai JW, 2008. Genome-wide Structural and Evolutionary Analysis of Cytochrome P450 Genes, and cDNA Cloning and Function of the Key Gene *CYP18A1* in the Silkworm, *Bombyx mori*. PhD Dissertation, Southwest University, Chongqing. 47–93. [艾均文, 2008, 家蚕(*Bombyx mori*)全基因组细胞色素 P450 基因结构与进化分析及 *CYP18A1* 克隆与功能研究. 重庆: 西南大学博士学位论文. 47–93]
- Ai JW, Wang GH, Li YH, Yu QY, Zhang XS, Zhu Y, Xiang ZH, 2008. Molecular cloning, sequence analysis and transcriptional activity determination of cytochrome P450 gene *CYP18A1* in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 51(3): 237–245. [艾均文, 王根洪, 李艳红, 余泉友, 张学松, 朱勇, 向仲怀, 2008. 家蚕 P450 基因 *CYP18A1* 的克隆、序列分析及转录活性. 昆虫学报, 51(3): 237–245]
- Ai JW, Yu QY, Cheng TC, Dai FY, Zhang XS, Zhu Y, Xiang ZH, 2010. Characterization of multiple *CYP9A* genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Rep.*, 37: 1657–1664.
- Ai JW, Zhu Y, Duan J, Yu QY, Zhang GJ, Wan F, Xiang ZH, 2011. Genome-wide analysis of cytochrome P450 monooxygenase genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene*, 480: 42–50.
- Bassett MH, McCarthy JL, Waterman MR, Sliter TJ, 1997. Sequence and developmental expression of *Cyp18*, a member of a new cytochrome P450 family from *Drosophila*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 131: 39–49.
- Chen YH, Wei ZG, Li B, Wang D, Zhao HQ, Shen WD, 2006. Cloning and sequence analysis of *CYP305B1v1* gene of *Bombyx mandarina* M. *Acta Sericologica Sinica*, 32(2): 32–36. [陈玉华, 卫正国, 李兵, 王东, 赵华强, 沈卫德, 2006. 野桑蚕 *CYP305B1V1* 基因的克隆与序列分析. 蚕业科学, 32(2): 32–36]
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15: 615–636.
- Coon MJ, 2005. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 1–25.
- Davies L, Williams DR, Turner PC, Rees HH, 2006. Characterization in relation to development of an ecdysteroid agonist-responsive cytochrome P450, *CYP18A1*, in Lepidoptera. *Arch. Biochem. Biophys.*, 453(1): 2–10.
- d' Alençon E, Sezutsu H, Legeai F, Pernal E, Bernard-Samain S, Gimenez S, Gagneur C, Cousserans F, Shimomura M, Brun-Barale A, Flutre T, Couloux A, East P, Gordon K, Mita K, Quesneville H, Fournier P, Feyereisen R, 2010. Extensive syntenic conservation of holocentric chromosomes in Lepidoptera despite high rates of local genome rearrangements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(17): 7680–7685.
- Feyereisen R, 2005. Insect cytochrome P450. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS eds. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Vol. 4. Elsevier, Oxford. 1–77.
- Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. *Biochemical Society Transactions*, 34: 1252–1255.
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J, 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, 151: 1531–1545.
- Gao RN, Wei ZG, Zhang T, Wang RX, Zhao GD, Li B, Shen WD, 2010. Changes in the expression of the CYP3 family genes under the induction of ecdysone in *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 53(9): 943–948. [高瑞娜, 卫正国, 张婷, 王瑞娟, 赵国栋, 李兵, 沈卫德, 2010. 蜕皮激素诱导下家蚕 CYP3 基因家族的表达变化. 昆虫学报, 53(9): 943–948]
- Gilbert W, 1987. The exon theory of genes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 52: 901–905.
- Gotoh O, 1998. Divergent structures of *Caenorhabditis elegans* cytochrome P450 genes suggest the frequent loss and gain of introns during the evolution of nematodes. *Mol. Biol. Evol.*, 15(11): 1447–1459.
- Gotoh O, 1993. Evolution and differentiation of P-450 genes. In: Omura T, Ishimura Y, Fuji-Kuriyama Y eds. *Cytochrome P-450*. 2nd ed. Kodansha, Tokyo. 255–272.
- Guittard E, Blais C, Maria A, Parvy JP, Pasricha P, Lumb C, Lafont R, Daborn PJ, Dauphin-Villemant C, 2011. *CYP18A1*, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. *Developmental Biology*, 349: 35–45.
- Guo TT, Jiang H, Gao XW, 2009. Diversity, evolution and expression regulation of cytochrome P450 monooxygenase genes in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 52(3): 301–311. [郭亭亭, 姜辉, 高希武, 2009. 昆虫细胞色素 P450 基因的多样性、进化及表达调控. 昆虫学报, 52(3): 301–311]
- Helvig C, Koener JF, Unnithan GC, Feyereisen R, 2004. *CYP15A1*, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 4024–4029.
- Hemingway J, Field L, Vontas J, 2002. An overview of insecticide resistance. *Science*, 298: 96–97.
- Horike N, Takemori H, Nonaka Y, Sonobe H, Okamoto M, 2000. Molecular cloning of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase from silkworm eggs. Its involvement in 20-hydroxyecdysone biosynthesis during embryonic development. *European Journal of Biochemistry*, 267(23): 6914–6920.
- Hossain M, Shimizu S, Matsuki M, Imamura M, Sakurai S, Iwami M, 2008. Expression of 20-hydroxyecdysone-induced genes in the silkworm brain and their functional analysis in post-embryonic

- development. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38: 1001–1007.
- Hurban P, Thummel C, 1993. Isolation and characterization of fifteen ecdysone-inducible *Drosophila* genes reveal unexpected complexities in ecdysone regulation. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 7101–7111.
- Li B, Xia QY, Lu C, Zhou ZY, Xiang ZH, 2005. Analysis of cytochrome P450 genes in silkworm genome (*Bombyx mori*). *Science in China*, 48: 414–418.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2002. Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. *Nature*, 419 (6908): 712–715.
- Maeda S, Nakashima A, Yamada R, Hara N, Fujimoto Y, Ito Y, Sonobe H, 2008. Molecular cloning of ecdysone 20-hydroxylase and expression pattern of the enzyme during embryonic development of silkworm *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149(3): 507–516.
- Mi Z, Liu ZY, Zhu Y, Li AX, Zeng YQ, Du WH, Long YH, 2010. Influence of fluoride on contents of cytochromes P450 and b5 in midgut of *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*, 36(3): 539–543. [米智, 柳照应, 朱勇, 李傲祥, 曾媛琴, 杜文华, 隆耀航, 2010. 添食氟化物对家蚕中肠组织细胞色素 P450 和 b5 含量的影响. 蚕业科学, 36(3): 539–543]
- Namiki T, Niwa R, Sakudoh T, Shirai K, Takeuchi H, Kataoka H, 2005. Cytochrome P450 CYP307A1/Spook: a regulator for ecdysone synthesis in insects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337: 367–374.
- Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW, 2004. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*, 14(1): 1–18.
- Niwa R, Matsuda T, Yoshiyama T, Namiki T, Mita K, Fujimoto Y, Kataoka H, 2004. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 35942–35949.
- Niwa R, Sakudoh T, Namiki T, Saida K, Fujimoto Y, Kataoka H, 2005. The ecdysteroidogenic P450 *Cyp302a1/disembodied* from the silkworm, *Bombyx mori*, is transcriptionally regulated by prothoracicotropic hormone. *Insect Molecular Biology*, 14: 563–571.
- Omura T, 1993. Localization of cytochrome P450 in membranes: mitochondria. In: Schenkman JB, Greim H eds. *Cytochrome P450*. Springer, Berlin. 61–69.
- Ono H, Rewitz KF, Shinoda T, Itoyama K, Petryk A, Rybczynski R, Jarcho M, Warren JT, Marqués G, Shimell MJ, Gilbert LI, O'Connor MB, 2006. Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Developmental Biology*, 298: 555–570.
- Rewitz KF, O'Connor MB, Gilbert LI, 2007. Molecular evolution of the insect Halloween family of cytochrome P450s: phylogeny, gene organization and functional conservation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(8): 741–753.
- Robertson HM, Wanner KW, 2006. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Research*, 16: 1395–1403.
- Rogozin IB, Wolf YI, Sorokin AV, Mirkin BG, Koonin EV, 2003. Remarkable interkingdom conservation of intron positions and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution. *Curr. Biol.*, 13: 1512–1517.
- Scott JG, Kasai S, 2004. Evolutionary plasticity of monooxygenase-mediated resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 78(3): 171–178.
- Scott JG, Liu N, Wen Z, 1998. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 121: 147–155.
- Snyder MJ, Hsu EL, Feyereisen R, 1993. Induction of cytochrome P-450 activities by nicotine in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Chem. Ecol.*, 19(12): 2903–2916.
- Tijet N, Helvig C, Feyereisen R, 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, 262: 189–198.
- Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452: 949–955.
- Wang YH, Wang D, Li B, Zhao HQ, Xu YX, Shen WD, 2009. Cloning and induced expression of CYPM5—a member of cytochrome P450 family from *Bombyx mandarina*. *Acta Sericologica Sinica*, 35(1): 78–83. [王燕红, 王东, 李兵, 赵华强, 许雅香, 沈卫德, 2009. 野桑蚕细胞色素 P450 家族 CYP4M5 基因的克隆和诱导表达. 蚕业科学, 35(1): 78–83]
- Warren JT, Petryk A, Marques G, Parvy JP, Shinoda T, Itoyama K, Kobayashi J, Jarcho M, Li Y, O'Connor MB, Dauphin-Villemant C, Gilbert LI, 2004. Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 991–1010.
- Yamamoto K, Ichinose, H, Aso Y, Fujii H, 2010. Expression analysis of cytochrome P450s in the silkworm, *Bombyx mori*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97: 106.
- Zhao HQ, Song LL, Li B, Shen WD, 2010. Cytochrome P450 oxidase activity determination and induced-transcription of CYP9 family genes in *Bombyx mandarina*. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 22(3): 287–291. [赵华强, 宋丽莉, 李兵, 沈卫德, 2010. 野桑蚕细胞色素 P450 氧化酶活性测定及 CYP9 家族基因的诱导转录. 浙江农业学报, 22(3): 287–291]
- Zhou HL, Chen KP, Yao Q, Gao L, Wang Y, 2008. Molecular cloning of *Bombyx mori* cytochrome P450 gene and its involvement in fluoride resistance. *J. Hazard. Mater.*, 160: 330–336.

(责任编辑: 赵利辉)